

БИОХИМИЯ

УДК 541. 49

ХЕЛАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕПАРИНА С БИОМЕТАЛЛАМИ (МЕДЬ, ЦИНК)

Ю.В. Францева, М.А. Феофанова, А.Н. Семенов

Тверской государственной университет

Исследовано комплексообразование высокомолекулярного гепарина с ионами меди (II) и цинка (II) с помощью методов рН-потенциометрического титрования и математического моделирования. Установлено, что ионы меди и цинка образуют ряд комплексов с гепарином, характеризующихся различной устойчивостью. Разница в устойчивости объясняется различным сродством этих ионов к донорным группам мономерного звена гепарина.

Ключевые слова: гепарин, комплекс, медь, цинк, хелатные комплексы гепарина.

Гепарин – биополимер, цепь которого построена из мономерных звеньев, состоящих из сульфатированных остатков α -L – идуроновой кислоты и α -D – глюкозамина, он является природным антикоагулянтом крови прямого действия, широко применяемым в медицине, обладающим фибринолитическим, противогипоксическим, анальгетическим, спазмолитическим и противовоспалительным действием. В живых организмах гепарин синтезируется в виде протеогликана, состоящего из белка серглицин, с которым ковалентно связаны многочисленные линейные полисахаридные цепочки гепарина [12]. Изучение молекулярной структуры гепарина очень важно с точки зрения сопоставления химической структуры этого вещества и его антикоагулянтных и других физиологических свойств. Обладая большим числом донорных групп, несущих отрицательный заряд, гепарин способен взаимодействовать с ионами различных металлов. Особый интерес представляет исследование комплексообразования гепарина с важнейшими биометаллами, так как это позволяет оценить его влияние на баланс ионов в плазме крови. Ионы меди и цинка играют важную роль в регуляции многих функций человеческого организма.

Медь содержится в организме в виде комплексных соединений с белками. Общее содержание меди в теле человека – 100 – 150 мг. Средняя концентрация меди в плазме крови составляет 0,75 – 1,3 мг/л [1]. Медь связывается с белками плазмы и поступает в печень, включаясь в церулоплазмин, откуда высвобождается в плазму крови. Большая часть – 92 – 96 % – прочно связана с белками сыворотки крови – соединение с альфа₂-глобулинами (церулоплазмин). Небольшая часть плазменной меди лабильно связана с альбуминами [6]. Физиологическое содержание цинка в плазме –

10 – 20 мкМ, а концентрация свободных, биологически активных катионов составляет порядка 0,2 – 1,0 нМ.

Цинк поступает в плазму крови, где связывается белками и ферментом карбоангидразой. В таком связанном состоянии цинк циркулирует с кровотоком и из плазмы крови попадает внутрь клеток. В сыворотке крови 70% цинка слабо связано с альбумином и другими белками [7].

Цель работы: исследование комплексообразования высокомолекулярного гепарина с ионами биометаллов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} .

Материалы и методы исследования. В качестве исходного препарата, содержащего гепарин, использовали фармакологический раствор его тетранатриевой соли, упакованный во флаконы по 5 мл. Производитель – Московский эндокринный завод. Каждый миллилитр такого раствора содержал 5000 ЕД, или 38,5 мг, соли. Поскольку большинство лигандов способно протонироваться, наиболее распространенным и удобным экспериментальным методом определения исследования процессов комплексообразования в системах $\text{M}^{2+} - \text{Na}_4\text{Hep} - \text{H}_2\text{O}$ (M^{2+} : Zn^{2+} , Cu^{2+}) явился рН-потенциометрический метод. Для этого готовили серии растворов, содержащих ионы металла и лиганда в разных мольных соотношениях.

Растворы хлоридов меди и цинка готовили растворением навесок солей в бидистилляте с последующей стандартизацией при помощи комплексонометрического титрования. Концентрации растворов были соответственно $C_{\text{Cu}^{2+}} = 1,20 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{Zn}^{2+}} = 1,12 \cdot 10^{-3}$ М. Квалификация солей – «чистый для анализа» («ч.д.а.»). Раствор фонового электролита (NaCl) – хлорида натрия («ч.д.а.») готовили растворением навески соли в бидистилляте. Бидистиллятом является дважды перекристаллизованная вода. Раствор соляной кислоты готовили из фиксанала и стандартизировали по тетраборнокислому натрию.

Предварительно гепарин переводили в форму кислоты введением 4 молей HCl на каждый моль мономерного звена. Растворы термостатировали и далее титровали стандартным раствором гидроксида натрия, регистрируя величину рН. Измерения рН проводили с помощью иономера И-135 с точностью определения рН, равной $\pm 0,01$ ед. Заданную температуру 37°C с точностью до 0,1 поддерживали с помощью термостата UTU - 2/77.

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью алгоритма AUTOEQUIL [2], позволяющего в режиме автоматизированного поиска адекватного набора химических равновесий определить значимые комплексные формы и рассчитать величины логарифмов констант образования этих форм. Математическая модель системы составляется с учетом химической специфики и координационных возможностей иона металла и лиганда.

Результаты исследования и их обсуждение. На первом этапе были исследованы химические равновесия в составляющей подсистеме: $\text{Na}_4\text{Hep} - \text{NaCl} - \text{H}_2\text{O}$. На рис. 1 представлена кривая рН-метрического титрования водного раствора Na_4Hep . На каждый моль мономерного звена гепарина вводили 4 моля хлороводородной кислоты для перевода гепарина из формы соли в форму кислоты.

Спектр возможных молекулярных форм исследуемой системы $\text{Na}_4\text{Hep}-\text{H}_2\text{O}$ задан расширенной компонентной матрицей стехиометрических коэффициентов этих форм в термодинамическом базисе H^+ , Hep^{4-} (табл. 1).

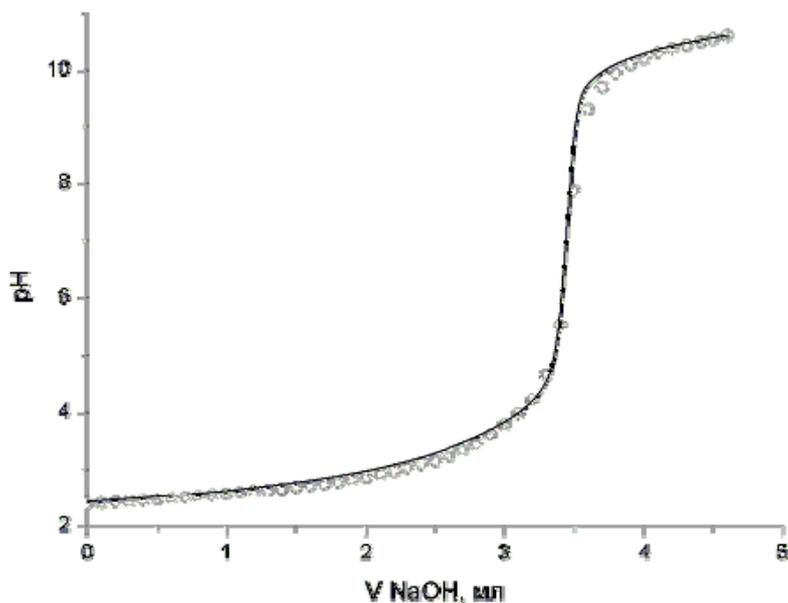


Рис. 1. Кривая титрования водного раствора гепарина + 4 экв. HCl на фоне $0,15 \text{ M NaCl}$ при температуре 37°C ,
 $C_{\text{hep}}=1,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}}=0,0048 \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,1410 \text{ M}$:
 точки – эксперимент, линия – расчет

Таблица 1

Молекулярная матрица системы $\text{Na}_4\text{Hep}-\text{H}_2\text{O}$, базис H^+ , Hep^{4-}

№	Молекулярная форма	$\text{Lg}(\beta_i)$	H^+	Hep^{4-}
1	H^+	0	1	0
2	Hep^{4-}	0	0	1
3	OH^-	-13,40	-1	0
4	HHep^{3-}	$\text{lg}\beta_1$	1	1
5	$\text{H}_2\text{Hep}^{2-}$	$\text{lg}\beta_2$	2	1
6	H_3Hep^-	$\text{lg}\beta_3$	3	1
7	H_4Hep	$\text{lg}\beta_4$	4	1

В результате моделирования химических равновесий идентифицирована только одна форма HHep^{3-} , отвечающая протонированию

карбоксильной группы фрагмента α -L – идуроновой кислоты [8]. Рассчитанное нами значение величины десятичного логарифма константы протонирования было сопоставлено с аналогичными значениями, приведенными в литературе (табл. 2).

Таблица 2
Величины десятичных логарифмов констант протонирования гепарина

$\lg\beta$	Источник
$3,62\pm 0,11$	наши данные
$4,70\pm 0,20$	Rabestein et al. [9]
$3,66\pm 0,04$	Карпухин и др. [3]
$3,79\pm 0,06$	Семенов и др. [5]
$3,62^*$	Katayama et al. [8]

Примечание. * – Указанная величина соответствует логарифму константы диссоциации α -L – идуроновой кислоты.

Концентрационная диаграмма распределения форм гепарина в растворе в зависимости от величины рН раствора представлена на рис. 2.

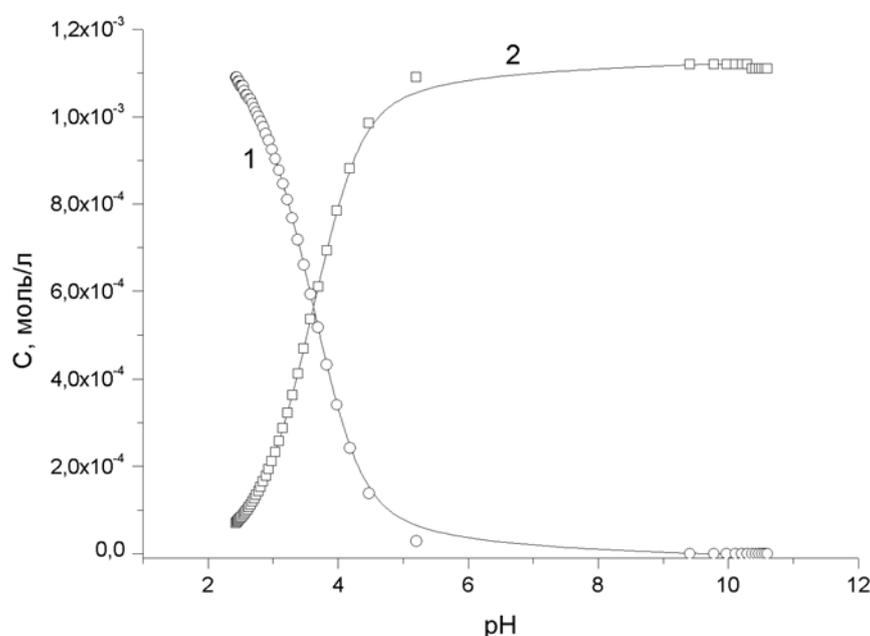


Рис. 2. Концентрационная диаграмма распределения форм гепарина в зависимости от рН в присутствии 0,15 М NaCl при температуре 37°C, $C_{\text{Hep}} = 1,16 \cdot 10^{-3}$ М, 1 – Hhep^{3-} , 2 – Hep^{4-}

На рис. 3 представлены кривые рН-метрического титрования систем $\text{MCl}_2 - \text{Na}_4\text{hep} - \text{NaCl} - \text{HCl} - \text{H}_2\text{O}$ (М: Cu^{2+} , Zn^{2+}) при эквивалентном

соотношении между компонентами. Для системы, содержащей ионы меди, гомогенность сохраняется во всем рабочем интервале pH, следовательно, ограничений при применении метода математического моделирования нет. В случае цинксодержащей системы гомогенность раствора нарушалась при достижении критической величины pH, следовательно, в областях существования твердой фазы процедура математического моделирования проведена быть не может, или же должна проводиться с учетом методики [4]. Область $pH > 8$ не информативна, тогда как область pH стабильности плазмы крови $6,8 \leq pH \leq 7,4$ имеет больший практический интерес. Исходя из этого, было принято решение в случае системы $Zn^{2+} - Na_4hep - H_2O - HCl$ проанализировать лишь те участки кривой титрования, на которых титруемый раствор заведомо гомогенен.

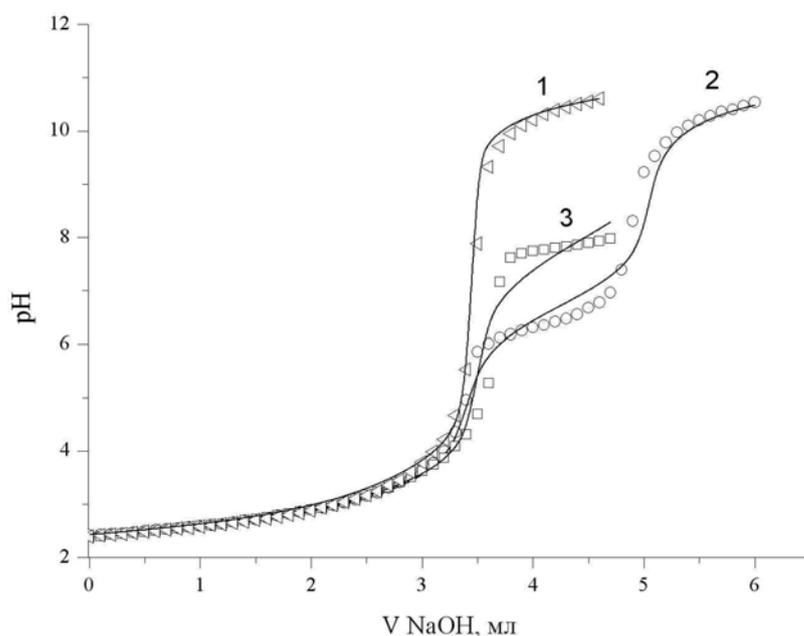


Рис. 3. Кривые титрования систем $Cu^{2+} - Na_4hep$ (2) и $Zn^{2+} - Na_4hep$ (3), $C_{Cu^{2+}} = 1,20 \cdot 10^{-3} M$, $C_{Zn^{2+}} = 1,12 \cdot 10^{-3} M$, $C_{hep4-} = 1,16 \cdot 10^{-3} M$, $C_{HCl} = 0,0048 M$, температура $37^\circ C$, ионная сила – $0,15 M NaCl$: точки – эксперимент, линии – расчет; для сравнения приведена кривая титрования гепарина (1): $C_{hep4-} = 1,16 \cdot 10^{-3} M$, $C_{HCl} = 0,0048 M$

В результате математической обработки экспериментальных данных было выявлено, что ионы меди и цинка образуют с гепарином однотипный набор комплексов – средние гепаринаты, а также смешаннолигандные гидросокомплексы, существующие при высоких величинах pH. Рассчитанные нами величины логарифмов констант образования идентифицированных комплексов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Величины логарифмов констант образования комплексов гепарина с ионами меди и цинка

Состав	$\lg\beta$	$\text{pH}_{\alpha_{\text{макс}}}$, ед.
CuHep^{2-}	$7,79 \pm 0,17$	4,17
CuOHHep^{3-}	$14,99 \pm 0,10$	6,49
$\text{Cu}(\text{OH})_2\text{Hep}^{4-}$	$21,44 \pm 0,11$	10,58
ZnHep^{2-}	$2,94 \pm 0,35$	4,72
ZnOHHep^{3-}	$9,58 \pm 0,20$	7,99
$\text{Zn}(\text{OH})_2\text{Hep}^{4-}$	$14,87 \pm 0,17$	8,12

Характер распределения комплексных форм в исследованных модельных системах отражают концентрационные диаграммы распределения, приведенные на рис. 4 и 5.

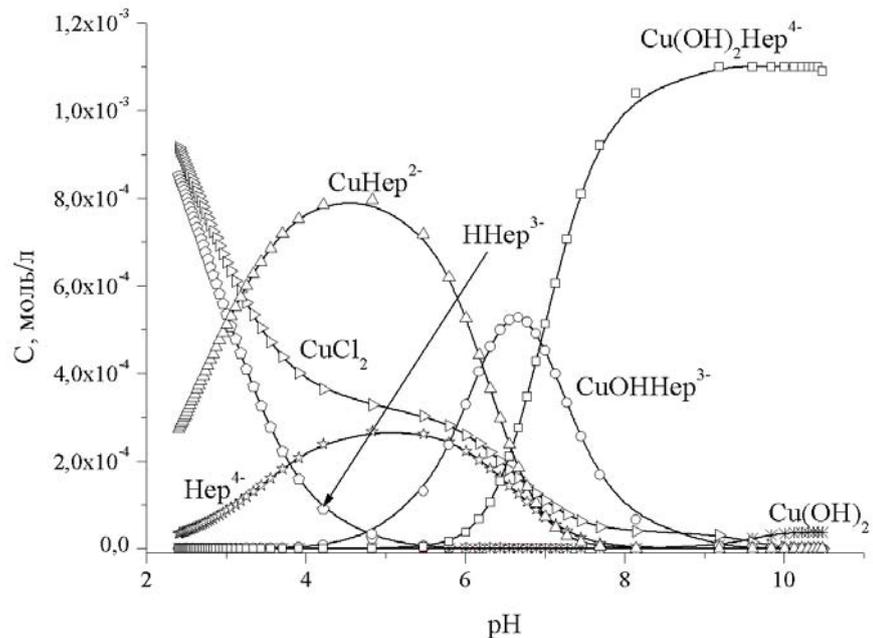


Рис. 4. Концентрационная диаграмма распределения комплексных форм в системе $\text{Cu}^{2+} - \text{Na}_4\text{hep} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCl}$, $C_{\text{Cu}^{2+}} = 1,20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{hep}^{4-}} = 1,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}} = 0,0048 \text{ M}$, температура 37°C , ионная сила – $0,15 \text{ M NaCl}$

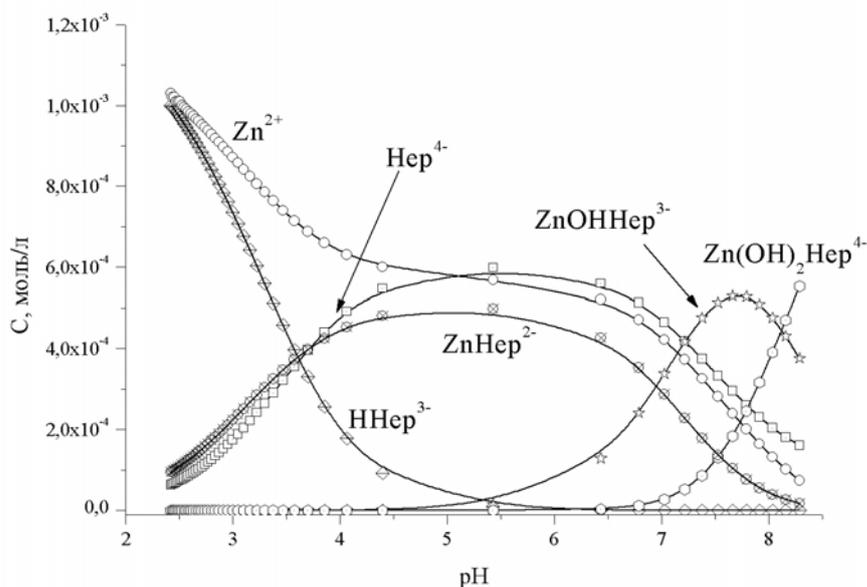


Рис. 5. Концентрационная диаграмма распределения комплексных форм в системе $Zn^{2+} - Na_4hep - H_2O - HCl$,
 $C_{Cu^{2+}} = 1,20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{hep^{4-}} = 1,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{HCl} = 0,0048 \text{ M}$,
 температура 37°C , ионная сила – $0,15 \text{ M NaCl}$

Как следует из рис. 4 и 5, средние гепаринаты меди и цинка доминируют в слабокислой области, однако сохраняют значительные концентрации и в области pH стабильности плазмы. В слабощелочной и щелочной областях доминируют смешаннолигандные гидроксокомплексы. Данные, позволяющие судить о процессах образования комплексов в системе «гепарин – ион металла», достаточно разнообразны, но порой весьма противоречивы. Гепарин имеет несколько типов донорных групп: карбоксильная, сульфогруппы, гидроксогруппы, гликозидный и эфирный кислород, карбонильный кислород и амидный азот. Хотя непосредственное участие амидной группы в образовании связей маловероятно, все же полностью не исключается. Таким образом, в образовании комплексов преимущественно участвуют атомы кислорода. Образование хелатных циклов с участием депротонированных гидроксильных групп рибозных колец маловероятно, а вот участие в процессе координации гликозидных атомов кислорода является наиболее предпочтительным вариантом. Остается возможность образования хелатных циклов достаточно большого размера, к появлению которых может привести замыкание донорных группировок, принадлежащих разным субъединицам мономерного звена на центральном ионе [9; 11]. Согласно [13], ионы меди координируются карбоксильной группой α -L-идуронового кольца, кольцевым атомом кислорода идуронат-2-О-сульфата, гликозидным атомом кислорода, а также 6-О-сульфатной группой D-глюкозаминового фрагмента.

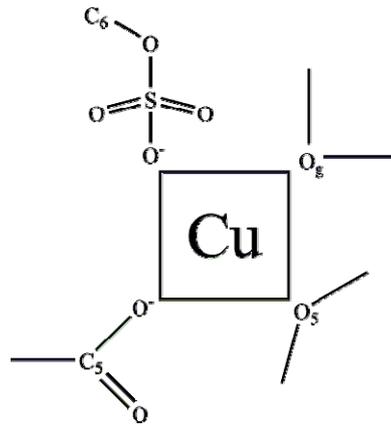


Рис. 6. Предполагаемая схема координации иона меди четырьмя донорными группами мономерного звена гепарина [по: 13]

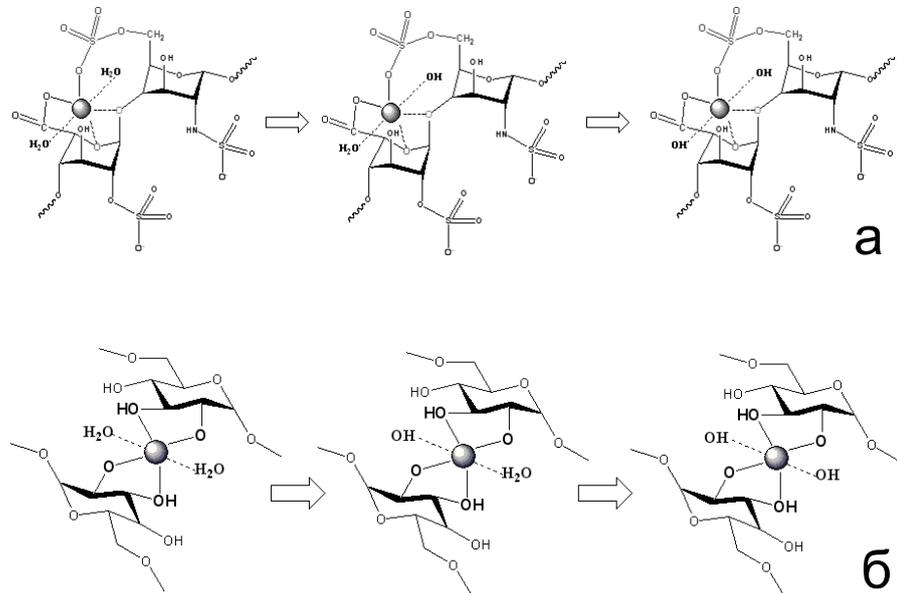


Рис. 7. Сравнение механизмов взаимодействия ионов меди с гепарином (а) с аналогичными взаимодействиями ионов меди с декстраном (б) [по: 10]

Исходя из идентифицированного набора комплексных форм для обеих систем, можно полагать, что в слабокислой области ионы меди и цинка связаны с донорными группами и, кроме того, за счет реализации координационного числа, равного 6, ионы меди дополнительно координируют две молекулы воды, учесть которые при составлении модели невозможно. Гидролиз ионов меди и цинка протекает непосредственно в «матрице»; происходит последовательное замещение молекул воды в координационной сфере на гидроксид-ионы.

Для примера приведем схему последовательного образования всего набора комплексных форм в системе $\text{CuCl}_2 - \text{Na}_4\text{hep}$ (рис. 6). Следует отметить, что аналогичный механизм образования комплексных форм характерен, для чего и обнаружен и при взаимодействии ионов меди с декстраном. Видно (рис. 7), что в случае гепарина, координация двух цепей невозможна прежде всего в силу большей дентатности гепарина, нежели декстрана. В первом случае монозвено ведет себя как четырехдентатный лиганд, тогда как во втором (декстран) – монозвено бидентатно.

Точных сведений о механизме координации ионов цинка гепарином нет.

Для подтверждения выводов, полученных методами рН – метрического титрования и математического моделирования при изучении взаимодействия ионов меди с гепарином выделили комплексную форму с максимумом концентрации при 10 ед. рН, полагая, что ее состав может быть описан формулой $\text{Na}_4[\text{CuHep}(\text{OH})_2]$. Для этого смешали рассчитанные количества реагентов, довели рН до требуемого значения с помощью раствора гидроксида натрия. При этом наблюдали образование раствора синей окраски. Комплекс осадил ацетоном, отделили центрифугированием и высушили в токе теплого воздуха. Полученный комплекс представляет собой стеклообразное хрупкое вещество зеленовато-синего цвета. Легко растворим в воде. Раствор устойчив в течение длительного времени. Для подтверждения количественного состава навеску комплекса растворили и оттитровали трилоном - Б в среде аммиачного буфера и в присутствии мурексида в качестве металлохромного индикатора. Было найдено, что в выделенном веществе содержится 8,82% меди по массе, тогда как теоретическое содержание меди в комплексе составляет величину порядка 7,85%. Полученный результат может говорить о том, что выделенному веществу реально соответствует предложенная стехиометрия и выводы, полученные при математическом моделировании исследованных систем, корректны. В результате проведенного исследования установлено, что ионы Cu^{2+} , Zn^{2+} , образуют ряд комплексов с гепарином, характеризующихся различной устойчивостью. Разница в устойчивости соответствующих комплексных форм ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} с гепарином объясняется разным сродством этих ионов к донорным группам мономерного звена гепарина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологическая роль микроэлементов и их применение в сельском хозяйстве и медицине / Под ред. Я.В. Пейве. М., 1974.
2. Евсеев А.М., Николаева Л.С. Математическое моделирование химических равновесий. М., 1988.
3. Карпунин Л.Е., Феофанова М.А., Николаева Л.С., Мамонтов М.Н., Добрынина Н.А. Комплексообразование ионов магния и кальция с гепарином // Журн. неорг. химии. 2006. Т. 51, № 6. С. 979 – 985.
4. Николаева Л.С., Семенов А.Н., Мамонтов М.Н. Расчет химических равновесий в системах $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 - \text{H}_2\text{O}$, $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 - \text{гепарин-H}_2\text{O}$,

$\text{CaCl}_2 - \text{Tb}(\text{NO}_3)_3 - \text{гепарин-H}_2\text{O}$ в среде физиологического раствора // Журн. неорган. химии. 2008. Т. 53, №5. С. 890 – 896.

5. Семенов А.Н., Николаева Л.С., Мамонтов М.Н., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Феофанова М.А. Сравнительный анализ процессов комплексообразования ионов магния и кальция с низкомолекулярным и нефракционированным гепарином // Журн. неорг. химии. 2007. Т. 52, №4. С. 706 – 712.

6. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М., 1989.

7. Хьюз. М. Неорганическая химия биологических процессов. М., 1983.

8. Katayama T., Takai E.I., Kariyama R., Kanemasa Y. Colloid titration of heparin using Cat-Floc (polydiallyldimethyl ammonium chloride) as standard polycation // Anal. Biochem. 1978. V. 88. P. 382 – 387.

9. Rabenstein D.L., Robert J. M., Peng J. Rabenstein D.L., Robert J. M., Peng J. Multinuclear magnetic resonance studies of the interaction of inorganic cations with heparin // Carbohydrate research. 1995. V. 278. P. 239 – 256.

10. Nikolić G.S, Cakić M, Mitić Ž. Deconvoluted Fourier-transform LNT-IR study of coordination copper (II) compounds with dextran derivatives // Russian Journal of Coordination Chemistry. 2008. V. 34, №. 5. P. 322 – 328.

11. Grushka E., Cohen A. S. The Binding of Cu(II) and Zn(II) Ions by Heparin // Analytical Letters. 1982. V. 15, №. 16. P. 1277 – 1288.

12. Riesenfeld J., Thunberg L., Höök M., Lindahl U. The antithrombin-binding sequence of heparin. Location of essential N-sulfate groups. // J. Biol. Chem. 1981. 10 Mar. P. 2389 – 2394.

13. Rudd T. R., Skidmore M. A. Site-specific interactions of copper(II) ions with heparin revealed with complementary (SRCD, NMR, FTIR and EPR) spectroscopic techniques // Carbohydrate Res. 2008. V. 343. P. 2184 – 2193.

THE CHELAT COMPLEXES OF HEPARIN WITH BIOMETALL (COPPER, ZINC)

Yu.V. Franceva, M.A. Feofanova, A.N. Semenov

Tver State University

It is investigated complex high-molecular heparin with copper ions (II) and zinc (II) by means of methods pH – potentiometric titration and mathematical modelling. It is established that copper and zinc ions form a number of complexes with heparin, characterised by various stability. The difference in stability speaks various affinity of these ions to донорным to groups of a monomeasured link heparin.